

ISTITUTO D'IGIENE DELLA R. UNIVERSITÀ DI PARMA
diretto dal Prof. E. BERTARELLI

A. TEDESCHI

METODO PRATICO
pei trapianti di laboratorio
DEI GERMI ANAEROBII



PARMA
TIPOGRAFIA COOP. PARMENSE
1909.

ISTITUTO D'IGIENE DELLA R. UNIVERSITÀ DI PARMA
diretto dal Prof. E. BERTARELLI

A. TEDESCHI

METODO PRATICO
pei trapianti di laboratorio
DEI GERMI ANAEROBII



PARMA
TIPOGRAFIA COOP. PARMENSE
1909.

Estratto dal Bollettino della Società Medica di Parma
Serie II - Anno II - Num. 7 (Luglio 1909)

Lo studio dei germi anaerobii, che in questi ultimi anni va assumendo sempre maggior interesse, specialmente dal punto di vista della biochimica intestinale, presenta sempre parecchie difficoltà, fra le quali non ultima è la complicazione di tecnica dei metodi di cultura fin qui usati nei laboratorii, complicazione che li rende in genere non perfettamente rispondenti agli scopi prefissi.

I metodi di sostituire l'aria con gaz inerti (Met. Penso coll'idrogeno ecc.), l'introduzione delle culture in recipienti contenenti sostanze riducenti, (Metodo Buchner — acido pirogallico e idrato sodico o potassico e simili) danno buoni risultati, però richiedono preparazione alquanto lunga e presentano l'inconveniente di dover usare sempre terreni liquidi o terreni solidi in istrati sottilissimi.

È nota l'importante modificazione del Tarozi di introdurre materiali riducenti, usando come tali, pezzi di fegato, milza e di altri organi. Egli toglie agli animali (conigli) pezzi di questi organi, asetticamente, e li immerge in brodo sterile dove fa poi le culture aerobioticamente.

Tra gli inconvenienti di tale metodo, va ricordato quello, che, con questo, si possono soltanto far culture in terreni liquidi e in secondo luogo che le culture risultano spesso torbide, ed hanno l'aspetto di emulsione d'organi, cosa che rende difficile l'esame e danneggia assai la chiarezza dei preparati microscopici.

Fra le molte modificazioni al metodo Tarozi, ha importanza pratica quella del Bandini, che usò le stesse sostanze, (fegato e milza) però polverizzate e sterilizzate, facilitando così la manualità del metodo.

Il metodo Tarozzi e le modificazioni Bandini e simili danno, nonostante gl'inconvenienti già citati, risultati abbastanza soddisfacenti pei trapianti, non servono però affatto per gli isolamenti.

Marino dà un metodo per l'isolamento degli anaerobii, che mi pare assai pratico, e da esso sono partito per studiare l'argomento di questa breve nota. Marino usa come terreno di cultura il siero, con l'aggiunta di circa 0.50 0/10 di glucosio per la sua azione riduttrice.

Si serve poi di grandi tubi da saggio, nei quali introduce da 30 a 35 cc. di terreno nutritizio, e sterilizza.

Scioglie poi questo materiale a bagnomaria, e lo pone in termostato a 42. Lasciati circa mezz'ora i tubi a questa temperatura, fa la semina, introducendo in uno del materiale inquinante da studiarsi, con ansa o con pipetta.

Trattandosi di dover fare isolamenti, diluisce il più possibile il materiale, facendo trapianti dal primo tubo seminato in un secondo, da questo in un terzo e talvolta in un quarto.

Versa poi il contenuto di ciascun tubo entro il coperchio rovesciato di una scatola Petri sterile. Il materiale che è già a 42 o a meno consolida assai rapidamente al contatto del vetro. Immediatamente ricopre la superficie libera del siero solidificato colla stessa scatola Petri pure rovesciata. Lo strato di materiale viene così ad essere leggermente compresso fra due superfici di vetro; la parte centrale specialmente sarà quindi priva d'ossigeno, ed anche difficilmente accessibile ad esso.

Questo metodo assai semplice, risponde bene allo scopo: ha però talvolta degli inconvenienti, dovuti alle ineguaglianze di superficie delle scatole Petri, le quali permettono che dell'ossigeno resti a contatto del siero, disturbando lo sviluppo degli anaerobii.

Lotti in un suo lavoro sugli anaerobii intestinali accenna a questo metodo, avendolo usato con risultati soddisfacenti.

Il metodo Marino se si presta bene per gli isolamenti, non può però aver applicazioni pei comuni trapianti di laboratorio, pei quali, generalmente, si ricorre alle culture alla Buchner, al metodo Tarozzi e modificazioni, o talvolta al procedimento delle culture per infissione in agar con successiva sovrapposizione di un alto strato di olio di vaselina o di agar.

Quest'ultimo dispositivo semplice e comodo dà però, spesso, inquinamenti dello strato superiore di agar.

Avendo occasione di coltivare sistematicamente alcuni anaerobi, mi sono persuaso degli inconvenienti di tutti questi metodi,

e mi son convinto che da tutti vien lasciato in disparte il metodo più semplice e più pratico pei trapianti degli anaerobii, metodo le cui basi sono accennate in tutti i trattati, ma la cui applicazione fu fatta incidentalmente e forse non abbastanza apprezzata.

Come già dissi l'idea di studiare tale metodo mi venne dal metodo Marino e più precisamente della prima parte di detto metodo.

Marino usa fare le semine per gli isolamenti in grandi tubi con molto materiale nutritizio, io usai invece comuni tubi da saggio con circa 10 o 12 cc. di materiale ciascuno.

Come terreno di cultura, usai l'agar comune, senza alcuna aggiunta.

Ho tenuto l'agar fuso per circa una mezz'ora a 42, poi ho fatti i trapianti.

Per far questo, ho usato una grossa ansa di platino, portando il materiale inquinante al fondo e agitando come per una comune cultura in brodo. Fatta la semina si raffredda rapidamente l'agar, che si consolida subitamente, scacciando qualsiasi traccia d'ossigeno.

Però, in tal modo ottenevo culture abbastanza buone, ma spesso il materiale seminato tendeva a salire alla superficie, e abbastanza spesso veniva a contatto dell'ossigeno, impedendo l'attecchimento del germe anaerobio seminato.

Per localizzare la semina al fondo dal tubo, ossia nel punto più lontano dall'ossigeno, usai delle perline di vetro da 2 mm. che comunemente servono per gli studi sugli antisettici.

Dopo averle umettate con brodo sterile, per impedire che resti aria aderente, io le inquino col germe da trapiantare, indi le immergo nell'agar a 42. Le perline pel loro peso vanno al fondo trascinando con sè il materiale di semina.

Raffreddo anche quì rapidamente le colture e pongo in termostato. Dopo 36 ore o più attorno alla perlina va formandosi un alone di colonie, che va poi ingrandendosi e che invade poi anche la parte sovrastante di agar.

Ho usato tale metodo cogli anaerobi più stretti, quali edema maligno e tetano ed inoltre col carbonchio sintomatico e col botulino, ottenendo risultati ottimi.

Per evitare gli inquinamenti, specialmente di muffe, occorre durante il trapianto, di tenere i tubi più inclinati che sia possibile.

Le perline sono di facilissima sterilizzazione portandole a secco a 80 per circa mezz'ora, e si maneggiano molto bene con una

pinza anatomica un po' grossa. In tal modo i trapianti seriali di germi anaerobii riescono bene, sicuramente e con abbondanza, senza bisogno di maneggio o di aggiunte alle culture, col rischio di inquinare.

Dati i risultati da me ottenuti coi germi suaccennati, mi è parso di qualche interesse il richiamare l'attenzione su un procedimento, forse poco conosciuto, certo poco apprezzato, ma che credo fermamente corrisponda assai meglio d'ogni altro, per la sua semplicità e sicurezza di riuscita, pei comuni trapianti di laboratorio, dei germi anaerobici.



